

氏 名	遠 藤 裕 平
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 652 号
学位授与年月日	令和 4 年 3 月 23 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	ゲノム全域の DNA 異常低メチル化は染色体不安定性を介して膵癌の浸潤能を増加させ潜在性転移及び予後を予測する
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 眞 嶋 浩 聡 (委 員) 教 授 北 山 丈 二 准教授 齋 藤 心 教 授 安 田 宏

論文内容の要旨

1 研究目的

膵癌は予後不良な癌種であり、多くの症例が遠隔転移を有する状態で診断される。そのため、唯一の根治治療である外科的切除の恩恵を受けることができる症例は限られる。さらに、術前検査の精度には限界があり、遠隔転移がないと判断され、根治手術を企図された症例のうち一定数が、開腹後にはじめて遠隔転移が見つかる（潜在性転移）ことが臨床上問題となる。潜在性転移症例では、手術による生存期間延長が望めないだけでなく、手術合併症リスクや創傷治癒及び体力回復までの期間を要することから、化学療法といった必要な治療導入を遅らせ予後の悪化をもたらす。不必要な開腹を避け、予後の改善を図るためには、潜在性転移を有する可能性が高い症例を特定し、適切な治療を適時に提供することが重要となる。

ゲノム全域の DNA 異常低メチル化は、多くの癌腫において共通してみられる分子的特徴であり、染色体不安定性を誘導する。染色体不安定性は腫瘍進展の主要な促進因子とされ、癌の転移形成に関与していると考えられている。しかしながら、染色体不安定性に関連した、膵癌の生物学的挙動に対するゲノム全域の DNA 異常低メチル化の影響を明らかにしようとした研究は今までにない。

本研究は、ゲノム全域の DNA 異常低メチル化が、ヒト膵癌細胞において染色体不安定性を介して浸潤能を促進するか、さらに、潜在性転移や予後といった膵癌の生物学的挙動と関連するかを検討、解明することを目的とする。

2 研究方法

まず、ゲノム全域の DNA 異常低メチル化が染色体不安定性を介して膵癌の表現型に影響を与えるかどうかを *in vitro* で検討した。ヒト膵癌細胞株（低転移株：PANC-1、高転移株：Capan-1）に異常低メチル化誘導剤（脱メチル化剤）である 5-aza-2'-deoxycytidine（5-Aza-dC）を用いて強制的に異常低メチル化を引き起こし、それにより染色体不安定性、浸潤・転移能が促進されるかを解析した。ゲノム全域の DNA 異常低メチル化レベルは、メチル化特異的定量 PCR である MethyLight 法を用いて、反復配列である long interspersed nucleotide element-1 (LINE-1) の相対的脱メチル化レベル（relative demethylation level: RDL）にて評価した。誘導された染色体不安定性は、

細胞免疫染色にて micronuclei や lagging, anaphase bridge, multiple nuclei といった染色体分離異常及び、 γ H2AX 染色にて DNA ダメージ測定、また、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション (comparative genomic hybridization : CGH) 解析による染色体コピー数変化にて評価した。細胞の浸潤能は、マトリゲル浸潤アッセイにて評価した。

次に、ゲノム全域の DNA 異常低メチル化が膵癌の生物学的挙動と関連するかどうかを、膵癌臨床検体を用いて検討した。術前に遠隔転移を認めず根治手術を企図した 49 例の膵癌症例の組織検体を用いた。これらの LINE-1 RDL と臨床因子やアウトカムとの関連を解析した。

3 研究成果

ヒト膵癌細胞に 5-Aza-dC を投与することで、ゲノム全域の DNA 異常低メチル化の誘導に成功し (LINE-1 RDL ; PANC-1; 0.19 ± 0.097 to 0.44 ± 0.067 , $P = 0.00002$, Capan-1; 0.28 ± 0.024 to 0.53 ± 0.066 , $P = 0.000005$)、染色体分離異常細胞数は有意に増加した (PANC-1 : $3.9 \pm 2.7\%$ to $12.5 \pm 3.6\%$, $P = 0.0005$)。同様に γ H2AX 陽性細胞数も有意に増加した (PANC-1 : $15.1 \pm 3.2\%$ to $55.6 \pm 7.9\%$, $P = 0.028$, Capan-1 : $47.8 \pm 8.4\%$ to $58.9 \pm 8.8\%$, $P = 0.0032$)。アレイ CGH 解析でも、両細胞とも特定の染色体領域のコピー数変化が確認された。浸潤アッセイでは、有意に浸潤細胞数が増加した (PANC-1; $16.6 \pm 11.9\%$ to $37.9 \pm 8.0\%$, $P = 0.042$, Capan-1; $35.4 \pm 11.4\%$ to $66.5 \pm 9.7\%$, $P = 0.011$)。

臨床検体での解析では、49 例中 7 例 (14.3%) に潜在性転移を認め、LINE-1 RDL と潜在性転移の有無に関連がみられたことから ($P = 0.034$)、ROC 解析にてカットオフ値を決定、高 LINE-1 RDL 症例は低 LINE-1 RDL 症例に比し有意に潜在性転移を多く有しており、また、LINE-1 RDL は潜在性転移を予測する有意な独立因子であった。さらに、予後に対する LINE-1 RDL の影響について検証したところ、有意な相関が認められ ($P = 0.0089$)、LINE-1 RDL は独立した予後因子であることがわかった。また、高 LINE-1 RDL 症例は低 LINE-1 RDL 症例に比し有意に生存期間が短かった ($P = 0.048$)。

4 考察

本研究は、5-Aza-dC により誘導されるゲノム全域の DNA 異常低メチル化が、染色体不安定性を介して膵癌細胞の表現型をより侵襲的にすることを初めて明らかにし、さらに、ゲノム全域の DNA 異常低メチル化の程度を表す LINE-1 RDL が、潜在性転移の有無や予後といった膵癌の生物学的挙動に関連していることを明らかにした。

他の癌種における、癌細胞株の 5-Aza-dC によるゲノム全域の DNA 異常低メチル化誘導、並びにマウスモデルでのゲノム全域の DNA 異常低メチル化による染色体不安定性誘導、さらに実験的に染色体不安定性誘導による転移形成の報告は今までになされているが、膵癌での報告はなされていなかった。本研究では、5-Aza-dC による膵癌細胞のゲノム全域の DNA 異常低メチル化の誘導に成功し、染色体の分離異常や DNA ダメージ、染色体のコピー数変化を確認し、染色体不安定性が引き起こされたことを明らかにした。さらに、浸潤細胞数が増加しており、これらの結果から、ゲノム全域の DNA 異常低メチル化が、染色体不安定の誘導と関連して膵癌の表現型をより侵襲的に変化させることを明らかにした。

臨床検体の解析では、膵癌以外の複数の癌種において、LINE-1 の異常低メチル化が予後と関連するという過去の報告があったが、本研究にて膵癌における生存期間との有意な相関が明らかに

なった。また、術前検査で転移が認められず、根治手術を企図する膵癌患者にとって、潜在性転移を予測できるバイオマーカーを同定することは、予後を改善するために重要である。LINE-1 RDL が、テラーメイド治療を適時に提供するために、不必要な開腹手術を避け、審査腹腔鏡手術が望ましい症例を選択するための有用なエピジェネティックバイオマーカーとなり得ることが示唆された。

5 結論

本研究は、ゲノム全域の DNA 異常低メチル化が、染色体不安定性を誘導し膵癌細胞の浸潤能を増加させることを明らかにし、潜在性転移や予後といった膵癌の生物学的挙動に関連することを示した最初の報告である。LINE-1 RDL が、潜在性転移を予測し、適時適切な治療を受けるための有力なエピジェネティックバイオマーカーとなり、根治手術を企図する症例の治療戦略の一助となりうると考えられた。

論文審査の結果の要旨

膵癌は予後不良な癌種であり、多くの症例が遠隔転移を有する状態で診断される。そのため、唯一の根治治療である外科的切除の恩恵を受けることができる症例は限られる。術前検査の精度にも限界があり、遠隔転移がないと判断され、根治手術を企図された症例のうち一定数が、開腹後にはじめて遠隔転移が見つかる（潜在性転移）ことが臨床上問題である。潜在性転移症例では、手術による生存期間延長が望めないだけでなく、手術合併症リスクや創傷治癒及び体力回復までの期間を要することから、化学療法といった必要な治療導入を遅らせ予後の悪化をもたらす。不必要な開腹手術を避け、予後の改善を図るためには、潜在性転移を有する可能性が高い症例を特定し、適切な治療を適時に提供することが重要であるが、そのようなバイオマーカーはないのが現状である。

本研究は、5-Aza-dC により誘導されるゲノム全域の DNA 異常低メチル化が、染色体不安定性を介して膵癌細胞の表現型をより侵襲的にすることを初めて明らかにし、さらに、ゲノム全域の DNA 異常低メチル化の程度を表す LINE-1 RDL が、潜在性転移の有無や予後といった膵癌の生物学的挙動に関連していることを明らかにしたものである。

ヒト膵癌細胞株（低転移株：PANC-1、高転移株：Capan-1）に異常低メチル化誘導剤（脱メチル化剤）5-aza-2'-deoxycytidine（5-Aza-dC）を用いて異常低メチル化を惹起し、染色体不安定性、浸潤能を検討した。次に膵癌臨床検体を用いてゲノム全域の DNA 異常低メチル化が膵癌の臨床病理学的因子と関連するかどうかを解析した。その結果、ヒト膵癌細胞にゲノム全域の DNA 異常低メチル化を誘導することで、染色体不安定性が増し、浸潤能が増すことが示された。また、膵癌症例の中で、高 LINE-1 RDL 症例は低 LINE-1 RDL 症例に比べて潜在性転移が有意に多く、独立した予後不良因子でもあった。これらは新規の知見であり、将来的にはこの評価方法を EUS-FNA を用いた検体やリキッドバイオプシー検体に応用し、高 LINE-1 RDL が潜在性転移の予測因子であることを示すことができれば、膵癌の治療方法の選択に益すること大である。

修正点としては、①本文と figure legend の分かりにくさ、②倫理審査番号を追記、③浸潤能は実験で評価されているが、転移能までは評価されていない、④原発巣と転移巣の LINE-1 RDL

値の差に関する記載、などが指摘された。これらは学位論文、論文要旨で適切に修正された。

本論文は International Journal of Oncology に投稿され、現在 revision 中である。追加実験は要求されておらず、文献を追加しての discussion の展開等の minor revision のようである。

以上から、本論文は学問的意義および新規性を有しており、本学学位論文として適正なものであると考えられ、合格と判定した。

最終試験の結果の要旨

膵癌は予後不良な癌種であり、多くの症例が遠隔転移を有する状態で診断される。そのため、唯一の根治治療である外科的切除の恩恵を受けることができる症例は限られる。術前検査の精度にも限界があり、遠隔転移がないと判断され、根治手術を企図された症例のうち一定数が、開腹後にはじめて遠隔転移が見つかる（潜在性転移）ことが臨床上問題である。潜在性転移症例では、手術による生存期間延長が望めないだけでなく、手術合併症リスクや創傷治癒及び体力回復までの期間を要することから、化学療法といった必要な治療導入を遅らせ予後の悪化をもたらす。不必要な開腹手術を避け、予後の改善を図るためには、潜在性転移を有する可能性が高い症例を特定し、適切な治療を適時に提供することが重要であるが、そのようなバイオマーカーはないのが現状である。

本研究は、5-Aza-dC により誘導されるゲノム全域の DNA 異常低メチル化が、染色体不安定性を介して膵癌細胞の表現型をより侵襲的にすることを初めて明らかにし、さらに、ゲノム全域の DNA 異常低メチル化の程度を表す LINE-1 RDL が、潜在性転移の有無や予後といった膵癌の生物学的挙動に関連していることを明らかにしたものである。

遠藤裕平氏の発表は研究の背景、目的、方法、結果、考察に関して十分な内容であり説得力があった。また、今後は EUS-FNA を用いた検体やリキッドバイオプシー検体で測定できる可能性についても言及し、研究の発展性も望める内容であった。膵臓癌のゲノム異常（遺伝子異常、メチル化異常、chromothripsis 等）に関する知識も十分であった。質疑応答では、浸潤能と転移能の違い、本研究結果と既報の結果の違い、二つの細胞株での核異常の違いなどに関して質問があったが、真摯に適格に答えることができた。修正点として①本文と figure legend の分かりにくさ、②倫理審査番号を追記、③浸潤能は実験で評価されているが、転移能までは評価されていない、④原発巣と転移巣の LINE-1 RDL 値の差に関する記載の追加、などが指摘・要求されたが、学位論文や論文要旨を適格に修正した。

以上から、遠藤裕平氏の研究能力、科学的素養、態度は学位に値するものであり、審査員全員の意見の一致のもと、最終試験を合格と判定した。